

A reprodukciót szabályozó kisspeptin neuronrendszer kémiai karakterizálása és kapcsolatrendszerének morfológiai vizsgálata emberi hipotalamuszban

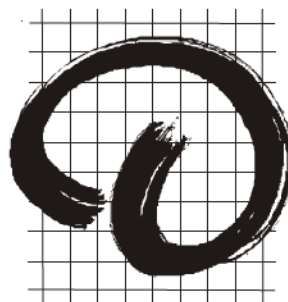
Doktori értekezés tézisei

Skrapits Katalin

Biológia Doktori Iskola, iskolavezető: Prof. Erdei Anna

Molekuláris Sejt- és Neurobiológia Doktori Program, programvezető: Prof. Sass Miklós

Eötvös Loránd Tudományegyetem Természettudományi Kar



Témavezető: Prof. Sass Miklós, egyetemi tanár, D.Sc.

Konzulens: Dr. Hrabovszky Erik, tudományos tanácsadó, D.Sc.

Készült:

Magyar Tudományos Akadémia Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézete

Endokrin Neurobiológia Kutatócsoport

Budapest, 2015

Bevezetés

Az emlősök szaporodásának szabályozását a reprodukív tengely végzi, melynek három, hierarchikusan egymásra épülő szintje a hipotalamusz, a hipofízis, valamint a gonádok. A reprodukív tengely kulcsszereppel bíró egysége a gonadotropin-releasing hormont (GnRH) termelő idegsejtek rendszere, a GnRH szekréció mintázata képezi ugyanis a hipotalamusz végső kimeneti jelét a hipofízis felé. A GnRH neuronok hormontartalmukat szabályos pulzusok formájában ürítik a hipofízis portális keringésébe. A GnRH az adenohipofízisben a luteinizáló hormon, valamint a follikulus stimuláló hormon elválasztását serkenti, melyek az ivarmirigyekben a nemi szteroidok (ösztrogének, tesztoszteron) termelődéséért felelnek. A nemi hormonok feedback szabályozás révén serkenthetik (nőstényekben, az ovulációt megelőzően), illetve gátolják (mindkét nemben) a reprodukív tengely felsőbb szintjeinek működését.

A GnRH neuronok szinaptikus (1) és parakrin (2) módon kommunikálnak egymással, illetve számos más idegsejttől fogadnak afferens információkat (3). Ez a kapcsolatrendszer „pulzusgenerátor”-ként működve felel az epizodikus GnRH szekréció kialakításáért (4). A GnRH szekréció végső mintázatának egyik legfontosabb alakítója a keringő nemi hormonok szintje (3,5). A GnRH neuronok azonban – mivel nem expresszálják az α típusú ösztrogén receptort – nem képesek közvetlenül fogadni az ösztrogén szignált (6), következésképpen a GnRH neuronokra gyakorolt ösztrogénhatás csak ösztrogén-érzékeny interneuronok közvetítésével valósulhat meg. Az ösztrogén-érzékeny idegsejtek közt kiemelt jelentőségűek a hipotalamuszban elhelyezkedő, kisszeptint (KP) termelő neuronpopulációk.

A KP jelátviteli útvonal nélkülözhetetlen szerepet játszik a reprodukció szabályozásában. A peptidet, illetve annak receptorát kódoló *KISS1* (7), illetve *KISS1R* (8,9) génekben bekövetkező inaktiváló mutációk emberben hipogonadotrop hipogonadizmust okoznak, mely súlyos reprodukív deficittel jár.

A legtöbb emlős fajban a KP-t termelő neuronoknak két fő csoportja létezik. Az egyik KP idegsejt-populáció a hipotalamusz preoptikus területén helyezkedik el, és nőstényekben valószínűleg az ösztrogén pozitív hatásának GnRH neuronokra történő közvetítéséért felel (10). Ezek a neuronok a KP mellett más neuropeptideket (met-enkefalin, galanin) és neurotranszmittereket (tirozin-hidroxiláz, GABA és glutamát) is kifejeznek.

A másik KP idegsejtcsoport a mediobazális hipotalamuszban, a *nucleus arcuatus*ban (ARC) található (11), és valószínűleg a GnRH pulzusgenerálásban, valamint a nemi

hormonok negatív feedback hatásának GnRH neuronok felé történő közvetítésében játszik szerepet. Számos emlősfajban az ARC-beli KP neuronok két másik neuropeptidet, neurokinin B-t és dinorfint is kifejeznek. E három neuropeptid (KP, NKB, Dyn) együttes jelenléte alapján ezeket az idegsejteket „KNDy” neuronoknak nevezzük (12). A KNDy sejtek közötti kommunikáció, valamint az egyedi KNDy neuronok autoregulációja valószínűleg az NKB/neurokinin-3 receptor (NK3R), valamint a Dyn/ κ -opioid receptor jelátviteli útvonalakon keresztül zajlik: az NKB serkentő és a Dyn gátló hatásának eredményeképpen alakul ki a KNDy neuronok által a GnRH idegsejtek felé közvetített végső kimeneti információ. A GnRH neuronok aktivációja a KP jelátviteli úton keresztül valószínűleg nélkülözhetetlen szerepet játszik az epizodikus hormonszekrécióban (13-15). Az NKB és a Dyn mellett az ARC KP sejtek galanint, valamint GABA-t és glutamátot is kifejeznek.

Mindkét KP neuronpopuláció emberben is létezik, a KP neuronok legnagyobb sejtszámmal jellemezhető csoportja azonban a mediobazális hipotalamusz infundibuláris területén helyezkedik el (16,17), és funkcionális szempontból valószínűleg analóg populációt alkot az ARC sejtjeivel. Bár a preoptikus területen elhelyezkedő KP idegsejtek neurokémiai jellemzőiről nincsenek adataink, az emberi reprodukció szabályozásában valószínűleg meghatározó szereppel bíró, infundibuláris régióban található KP sejtpopuláció neurokémiai karakterét részben már ismerjük.

A laboratóriumi állatok ARC-beli KP sejtjeihez hasonlóan, az ember infundibuláris régiójában lévő KP neuronok is szintetizálnak NKB-t (18) – és fordítva. A sejtek előfordulási gyakorisága, illetve a neuropeptid ko-expresszió mértéke azonban nagymértékben függ az egyedek nemétől (19), valamint életkorától (20). A Dyn jel viszont nem mutatható ki a humán KP és NKB neuronok perikarionjaiban, és a KP axonokban is csak elvétve detektálható (21). Ezek alapján a „KNDy neuron” terminológia emberi KP és NKB sejtek jelölésére csak bizonyos fenntartással használható. Ugyanakkor a KP és NKB neuronok jelentős része substance P (SP) neuropeptidet is kifejez (22) – hasonló neuropeptid-fenotípust laboratóriumi állatokban eddig még nem figyeltek meg. Az emberi szövetmintákon tett megfigyelések tehát éles ellentétben állnak a laboratóriumi állatok esetében tapasztaltakkal, ráirányítva a figyelmet a lehetséges faji különbségekre is.

Éppen ezért,

- fő célkitűzésünk az emberi hipotalamusz KP és NKB neuronjainak további neurokémiai karakterizálása és ko-transzmitter-fenotípusuk meghatározása volt. Munkánk során kiemelt figyelmet fordítottunk az ember és a laboratóriumi

állatok között megfigyelt faji különbségekre, hiszen – a szaporodás finomszabályozásának eltérő volta miatt – a laboratóriumi állatokon végzett kísérletek eredményeiből származó ismereteink csak részben vonatkoztathatók emberre, és használhatók fel a humán szaporodásbiológiai kérdések megoldására.

- További célunk az emberi KP és NKB neuronok kapcsolatrendszerének feltárása volt, különös tekintettel a hipotalamikus jeleket integráló GnRH neuronokon képzett axo-szomatikus és axo-dendritikus bemenetekre.
- Végül ugyancsak anatómiai megközelítést használva, felvetettük a KP, NKB és SP idegsejtek lehetséges axo-axonális kapcsolatait a GnRH neuronokkal, az utóbbiak hipofizeotróf axonvetületei mentén.

Alkalmazott módszerek

Humán szövetminták

Vizsgálatainkat emberi hipotalamusz mintákon végeztük, melyek igazságügyi boncolásokból származtak. A minták gyűjtését a Debreceni Egyetem Igazságügyi Orvostani Intézet munkatársai végezték. A személyes adatok anonimek voltak, a neurológiai és endokrin kórtörténet egyik személy esetében sem volt ismert. Minden esetben jellemző volt azonban a hirtelen bekövetkező halál és a kevesebb, mint 48 óra *post mortem* idő. A kísérletek a DEOEC RKEB/IKEB: 3183-2010 sz. engedély és a 1997 CLIV és 18/1998/XII.27. EU-M rendelet szerint folytak.

Fénymikroszkópos immunhisztokémia

A 30 µm vastag koronális metszeteken a megfelelő minta-előkészítés után peroxidáz-kimutatáson alapuló immunhisztokémiai kettős-festést (a GnRH neuronok afferens szabályozásának vizsgálata), illetve fluoreszcens többszörös jelölést végeztünk (ko-expressziós vizsgálatok). Az elsődleges ellenanyagok specifikusságát kontroll kísérletekkel igazoltuk (két, különböző állatfajban termeltetett antiszérum használata; kimerítés).

Mikroszkópia

A peroxidáz alapú kimutatás után a metszetekről Zeiss AxioImager M1 mikroszkóp (Carl Zeiss, Göttingen, Németország) AxioCam MRc 5 digitális kamerájának segítségével, míg a fluoreszcensen jelölt szövetmintákból Radiance 2100 konfokális mikroszkóppal (Bio-Rad Laboratories, Hemel Hempstead, Egyesült Királyság) készítettünk felvételeket.

Kvantitatív vizsgálatok

A ko-expressziós vizsgálatok során meghatároztuk a sejtestekben, illetve az axon varikozitásokban megjelenő neuropeptidok együttes előfordulásának arányát. Eredményeinket 3-5 emberi hipotalamusz mintából származó metszetek elemzésével kaptuk, átlag±SEM% értékben fejeztük ki, és kör- vagy oszlopdiagramon ábráztuk (Microsoft Excel 2010).

Eredmények, tézisek

Az emberi kisspeptin sejtek immunhisztokémiai profilja

1. Immunfluoreszcens hármás-jelölés segítségével megállapítottuk, hogy az emberi KP és NKB neuronok a cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) neuropeptidet is kifejezik.
2. A kvantitatív vizsgálataink eredményei szerint, posztmenopauzás nőkben a KP sejtek $47,9 \pm 6,6\%$ -a, míg az NKB neuronok $30,0 \pm 4,9\%$ -a tartalmazott CART neuropeptidet is. Az összes KP sejt $33,3 \pm 4,9\%$ -a fejezte ki mindhárom neuropeptidet egyszerre, míg az összes NKB idegsejt $28,2 \pm 4,6\%$ -a volt CART/KP/NKB hármás-jelölt.
3. Mivel az idegrostokban egyidejűleg jelenlévő neuropeptidek relatív gyakoriságának pontos meghatározására nem léteznek szoftverek, egy új kvantitatív megközelítést dolgoztunk ki az axonális neuropeptid ko-expresszió elemzésére.
4. Az általunk kidolgozott módszert alkalmazva megállapítottuk, hogy a KP axonok $17,0 \pm 2,3\%$ -a, míg az NKB rostok $6,2 \pm 2,0\%$ -a fejezett ki CART-ot is. Az összes dokumentált KP varikozitás $14,3 \pm 1,8\%$ -a volt CART/KP/NKB-pozitív, és az NKB axonok $5,9 \pm 2,0\%$ -a expresszálta egyszerre mindhárom neuropeptidet.
5. Megállapítottuk, hogy az általunk azonosított NKB neuropeptidet kifejező CART neuronok, valamint az emberben korábban már leírt (23) agouti-related proteint expresszáló CART idegsejtek külön populációt alkotnak.
6. Négyes immunfluoreszcens festéssel bebizonyítottuk, hogy a munkacsoportunk által korábban publikált, a KP és NKB neuropeptidek mellett SP-t is kifejező neuronpopuláció (22) részben azonos az általunk ismertetett CART/KP/NKB idegsejtekkel.
7. Megállapítottuk, hogy a CART-tartalmú KP, NKB és SP idegsejtek axo-szomatikus és axo-dendritikus kapcsolatokat létesítenek egymással az infundibuláris mag területén.

8. Kimutattuk, hogy idős férfiakban a KP és NKB idegsejtek egy része proenkefalint (pENK) is kifejez. A kvantitatív elemzés adatai szerint a KP neuronok $1,9 \pm 1,0\%$ -a, míg az NKB sejtek $12,5 \pm 5,1\%$ -a tartalmazott pENK-t. A ko-expresszió a rostok szintjén is megfigyelhető volt: a KP-IR axon varikozitások $4,9 \pm 1,8\%$ -ában, míg az NKB-IR rostok $5,7 \pm 2,5\%$ -ában detektáltunk pENK jelet.
9. További kolokalizációs vizsgálatokkal bemutattuk, hogy az emberi KP és NKB sejtek nem tartalmaznak szomatosztatint és – a laboratóriumi állatokhoz hasonlóan – agouti-related proteint, α -melanocita stimuláló hormont,olecisztokinint, neuropeptid Y-t és neurotenzint; viszont – rágsálókkal ellentétben – nem expresszálnak galanint és tirozin-hidroxilázt sem.

Új aspektusok a GnRH neuronok afferens szabályozásában

1. CART/KP/NKB/GnRH négyes immunfluoreszcens vizsgálatok segítségével megállapítottuk, hogy a GnRH neuronokon észlelt KP/NKB-tartalmú appozíciók egy része a CART neuropeptidet is kifejezi.
2. Immunhisztokémiai kettős-festést alkalmazva bemutattuk, hogy a hipofizeotróf GnRH axonokat KP, NKB, illetve SP rostok veszik körül a posztinfundibuláris eminentia, az infundibuláris nyél, valamint a neurohipofízis területén, és számos esetben axo-axonális kontaktusokat létesítenek a GnRH neuronokkal.
3. Mivel a SP/KP/NKB hármas immunfluoreszcens festés eredménye azt mutatta, hogy a három neuropeptid az infundibuláris nyél és a neurohipofízis területén részlegesen kolokalizál, feltételeztük, hogy a hipofizeotróf GnRH rostokkal kapcsolatot létesítő KP, NKB és SP axonok legalább részben az infundibuláris magból származnak, ahol e neuropeptidek gyakran együtt expresszálódnak (22).

Az eredmények megvitatása

A mediobazális hipotalamusz területén lévő KP neuronok ko-transzmitter-fenotípusa a fajok között sok esetben eltér. Az NKB peptid KP idegsejtekben való kifejeződése azonban általánosnak mondható laboratóriumi állatokban és emberben egyaránt. Emberben az NKB szaporodásban betöltött nélkülözhetetlen szerepét igazolja, hogy a *TAC3* (NKB), illetve *TAC3R* (NK3R) génekben bekövetkező funkcióvesztéses mutációk hipogonadotrop hipogonadizmust okoznak (24). Klinikai tanulmányok eredményei arra utalnak, hogy az NKB/NK3R jelátvitel a szexuális fejlődés korai szakaszában igen kritikus fontosságú, idővel azonban a reprodukív tengely működésére gyakorolt hatásának jelentősége csökken (25). Lehetséges, hogy egy másik tachykinin peptid, a SP (22), illetve más neurokinin receptorok (NK1R, NK2R) humán KP sejtekben való kifejeződése éppen az NKB/NK3R szignalizáció csökkenő hatását kompenzálja.

Laboratóriumi állatokban a KP neuronok legnagyobb része az NKB mellett a Dyn-t is expresszálja („KNDy terminológia”). Így tehát meglepő, hogy emberben a KP neuronok csak igen kis hányada fejezi ki a Dyn-t, némiképp megkérdőjelezve a Dyn általános szerepét a GnRH/luteinizáló hormon epizodikus szekréciójának szabályozásában. Nem kizárható azonban, hogy emberben a KP és NKB sejtek egy részében detektált – szintén az opioid peptidek családjába tartozó – pENK helyettesítheti a laboratóriumi állatokban kifejeződő Dyn (egy) funkcióit.

A CART peptidet a humán KP és NKB neuronok egy jelentős része expresszálja, azonban hasonló ko-expressziós fenotípus laboratóriumi állatokban nem figyelhető meg. A CART a metabolikus folyamatok szabályozása mellett a reprodukív tengely működésére is hatást gyakorol: energiaszegény körülmények (éhezés, szoptatás) között ugyanis valószínűleg hozzájárul a szaporodás gátlásához (26). Elektrofiziológiai kísérletek eredményei azt mutatják, hogy a CART egerekben (27) és patkányokban (26) képes közvetlenül serkenteni a GnRH neuronokat, ugyanakkor a GnRH neuronok működését indirekt módon is befolyásolhatja. Patkányokban a CART rostok kontaktust képeznek az ARC területén lévő KP idegsejtekkel, egerekben pedig serkentő hatást gyakorolnak azok működésére (26). Fontos azonban hangsúlyozni, hogy a CART GnRH és KP neuronok működésére gyakorolt excitatórikus hatását csak rágsálókban vizsgálták, a kísérletek eredményeiből főemlősökre vonatkozó következtetéseket levonni csak körültekintéssel érdemes. A KP-hez, NKB-hoz, valamint a SP-hez hasonlóan a CART autoreceptorokon, illetve posztszinaptikus

peptidreceptorokon keresztül hatva is befolyásolhatja a GnRH és/vagy KP, illetve NKB neuronok működését.

A humán KP és NKB neuronokban kifejeződő – ugyanakkor a laboratóriumi állatok KP sejtjeiben nem detektálható – SP és CART jelenléte arra utal, hogy az emberi KP sejtek az ösztrogénhatás GnRH neuronok felé történő közvetítéséhez más neuropeptid jelátviteli rendszereket használnak, így emberben a GnRH pulzusgenerálás finomszabályozása a laboratóriumi állatokétól nagymértékben eltérhet.

Az *eminentia mediana*/posztinfundibuláris eminentia területén az axonok között zajló feltehetően parakrin kommunikáció igen fontos szerepet játszik a neuroendokrin szabályozásban (28), sőt, számos kísérlet eredménye utal arra, hogy az axo-axonális kommunikáció lehet az elsődleges mechanizmus, melyen keresztül a KNDy neuronok a pulzatilis GnRH szekréciót befolyásolják.

Jelen tanulmányban bemutattuk, hogy posztmenopauzás nőkben a hipofizeotróf GnRH axonokkal kötegeket alkotva a KP rostok mellett NKB és SP axonok is futnak, és számos esetben axo-axonális kontaktusokat képeznek a GnRH rostokkal a posztinfundibuláris eminentia, a nyél és a neurohipofízis területén is, megteremtve ezzel egy parakrin kommunikációnak a lehetőségét. A leszálló KP, NKB és SP rostok egy része ráadásul azonos, mely egyértelműen utal infundibuláris mag-beli eredetükre, ahol ezek a neuropeptidek részlegesen kolokalizálnak (22).

A tézis alapjául szolgáló közlemények

Skrapits, K., Borsay, B.A., Herczeg, L., Ciofi, P., Bloom, S.R., Ghatei, M.A., Dhillon, W.S., Liposits, Z., Hrabovszky, E. (2014). Colocalization of cocaine- and amphetamine-regulated transcript with kisspeptin and neurokinin B in the human infundibular region. *PLoS One* 9(8):e103977. doi: 10.1371/journal.pone.0103977.

Borsay, B.A., **Skrapits, K.**, Herczeg, L., Ciofi, P., Bloom, S.R., Ghatei, M.A., Dhillon, W.S., Liposits, Z., Hrabovszky, E. (2014). Hypophysiotropic gonadotropin-releasing hormone projections are exposed to dense plexuses of kisspeptin, neurokinin B and substance P immunoreactive fibers in the human: a study on tissues from postmenopausal women. *Neuroendocrinology* 100(2-3):141-52. doi: 10.1159/000368362.

Skrapits, K., Borsay, B.A., Herczeg, L., Ciofi, P., Liposits, Z., Hrabovszky, E. (2015). Neuropeptide co-expression in hypothalamic kisspeptin neurons of laboratory animals and the human. *Frontiers in neuroscience* 9:29. doi: 10.3389/fnins.2015.00029.

Felhasznált irodalom

1. Witkin, J.W., Silverman, A.J. (1985). Synaptology of luteinizing hormone-releasing hormone neurons in rat preoptic area. *Peptides* 6, 263-271.
2. Lehman, M.N., Silverman, A.J. (1988). Ultrastructure of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons and their projections in the golden hamster. *Brain research bulletin* 20, 211-221.
3. Herbison, A.E. (1998). Multimodal influence of estrogen upon gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrine reviews* 19, 302-330.
4. Knobil, E. (1990). The GnRH pulse generator. *American journal of obstetrics and gynecology* 163, 1721-1727.
5. Petersen, S.L., Ottem, E.N., Carpenter, C.D. (2003). Direct and indirect regulation of gonadotropin-releasing hormone neurons by estradiol. *Biology of reproduction* 69, 1771-1778.
6. Shivers, B.D., Harlan, R.E., Morrell, J.I., Pfaff, D.W. (1983). Absence of oestradiol concentration in cell nuclei of LHRH-immunoreactive neurones. *Nature* 304, 345-347.
7. Topaloglu, A.K., Tello, J.A., Kotan, L.D., Ozbek, M.N., Yilmaz, M.B., Erdogan, S., Gurbuz, F., Temiz, F., Millar, R.P., Yuksel, B. (2012). Inactivating KISS1 mutation and hypogonadotropic hypogonadism. *The New England journal of medicine* 366, 629-635.
8. De Roux, N., Genin, E., Carel, J.C., Matsuda, F., Chaussain, J.L., Milgrom, E. (2003). Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 10972-10976.
9. Seminara, S.B., Messenger, S., Chatzidaki, E.E., Thresher, R.R., Acierno, J.S., Jr., Shagoury, J.K., Bo-Abbas, Y., Kuohung, W., Schwinof, K.M., Hendrick, A.G., Zahn, D., Dixon, J., Kaiser, U.B., Slaugenhaupt, S.A., Gusella, J.F., O'rahilly, S., Carlton, M.B., Crowley, W.F., Jr., Aparicio, S.A., Colledge, W.H. (2003). The GPR54 gene as a regulator of puberty. *The New England journal of medicine* 349, 1614-1627.
10. Herbison, A.E. (2008). Estrogen positive feedback to gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons in the rodent: the case for the rostral periventricular area of the third ventricle (RP3V). *Brain research reviews* 57, 277-287.
11. Lehman, M.N., Merkley, C.M., Coolen, L.M., Goodman, R.L. (2010). Anatomy of the kisspeptin neural network in mammals. *Brain research* 1364, 90-102.
12. Lehman, M.N., Coolen, L.M., Goodman, R.L. (2010). Minireview: kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cells of the arcuate nucleus: a central node in the control of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Endocrinology* 151, 3479-3489.
13. Navarro, V.M., Gottsch, M.L., Chavkin, C., Okamura, H., Clifton, D.K., Steiner, R.A. (2009). Regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion by kisspeptin/dynorphin/neurokinin B neurons in the arcuate nucleus of the mouse. *J Neurosci* 29, 11859-11866.
14. Ohkura, S., Takase, K., Matsuyama, S., Mogi, K., Ichimaru, T., Wakabayashi, Y., Uenoyama, Y., Mori, Y., Steiner, R.A., Tsukamura, H., Maeda, K.I., Okamura, H. (2009). Gonadotrophin-releasing hormone pulse generator activity in the hypothalamus of the goat. *J Neuroendocrinol* 21, 813-821.
15. Wakabayashi, Y., Nakada, T., Murata, K., Ohkura, S., Mogi, K., Navarro, V.M., Clifton, D.K., Mori, Y., Tsukamura, H., Maeda, K., Steiner, R.A., Okamura, H. (2010). Neurokinin B and dynorphin A in kisspeptin neurons of the arcuate nucleus participate in generation of periodic oscillation of neural activity driving pulsatile gonadotropin-releasing hormone secretion in the goat. *J Neurosci* 30, 3124-3132.
16. Hrabovszky, E. (2013). Neuroanatomy of the Human Hypothalamic Kisspeptin System. *Neuroendocrinology*.
17. Rometo, A.M., Krajewski, S.J., Voytko, M.L., Rance, N.E. (2007). Hypertrophy and increased kisspeptin gene expression in the hypothalamic infundibular nucleus of postmenopausal women and ovariectomized monkeys. *J Clin Endocrinol Metab* 92, 2744-2750.
18. Hrabovszky, E., Ciofi, P., Vida, B., Horvath, M.C., Keller, E., Caraty, A., Bloom, S.R., Ghatei, M.A., Dhillon, W.S., Liposits, Z., Kallo, I. (2010). The kisspeptin system of the human

- hypothalamus: sexual dimorphism and relationship with gonadotropin-releasing hormone and neurokinin B neurons. *Eur J Neurosci* 31, 1984-1998.
19. Hrabovszky, E., Molnar, C.S., Sipos, M.T., Vida, B., Ciofi, P., Borsay, B.A., Sarkadi, L., Herczeg, L., Bloom, S.R., Ghatei, M.A., Dhillon, W.S., Kallo, I., Liposits, Z. (2011). Sexual dimorphism of kisspeptin and neurokinin B immunoreactive neurons in the infundibular nucleus of aged men and women. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2, 80.
 20. Molnar, C.S., Vida, B., Sipos, M.T., Ciofi, P., Borsay, B.A., Racz, K., Herczeg, L., Bloom, S.R., Ghatei, M.A., Dhillon, W.S., Liposits, Z., Hrabovszky, E. (2012). Morphological evidence for enhanced kisspeptin and neurokinin B signaling in the infundibular nucleus of the aging man. *Endocrinology* 153, 5428-5439.
 21. Hrabovszky, E., Sipos, M.T., Molnar, C.S., Ciofi, P., Borsay, B.A., Gergely, P., Herczeg, L., Bloom, S.R., Ghatei, M.A., Dhillon, W.S., Liposits, Z. (2012). Low Degree of Overlap Between Kisspeptin, Neurokinin B, and Dynorphin Immunoreactivities in the Infundibular Nucleus of Young Male Human Subjects Challenges the KNDy Neuron Concept. *Endocrinology* 153, 4978-4989.
 22. Hrabovszky, E., Borsay, B.A., Racz, K., Herczeg, L., Ciofi, P., Bloom, S.R., Ghatei, M.A., Dhillon, W.S., Liposits, Z. (2013). Substance P immunoreactivity exhibits frequent colocalization with kisspeptin and neurokinin B in the human infundibular region. *PLoS One*, in press.
 23. Menyhart, J., Wittmann, G., Lechan, R.M., Keller, E., Liposits, Z., Fekete, C. (2007). Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) is colocalized with the orexigenic neuropeptide Y and agouti-related protein and absent from the anorexigenic alpha-melanocyte-stimulating hormone neurons in the infundibular nucleus of the human hypothalamus. *Endocrinology* 148, 4276-4281.
 24. Topaloglu, A.K., Reimann, F., Guclu, M., Yalin, A.S., Kotan, L.D., Porter, K.M., Serin, A., Mungan, N.O., Cook, J.R., Ozbek, M.N., Imamoglu, S., Akalin, N.S., Yuksel, B., O'rahilly, S., Semple, R.K. (2009). TAC3 and TACR3 mutations in familial hypogonadotropic hypogonadism reveal a key role for Neurokinin B in the central control of reproduction. *Nature genetics* 41, 354-358.
 25. Gianetti, E., Tusset, C., Noel, S.D., Au, M.G., Dwyer, A.A., Hughes, V.A., Abreu, A.P., Carroll, J., Trarbach, E., Silveira, L.F., Costa, E.M., De Mendonca, B.B., De Castro, M., Lofrano, A., Hall, J.E., Bolu, E., Ozata, M., Quinton, R., Amory, J.K., Stewart, S.E., Arlt, W., Cole, T.R., Crowley, W.F., Kaiser, U.B., Latronico, A.C., Seminara, S.B. (2010). TAC3/TACR3 mutations reveal preferential activation of gonadotropin-releasing hormone release by neurokinin B in neonatal life followed by reversal in adulthood. *J Clin Endocrinol Metab* 95, 2857-2867.
 26. True, C., Verma, S., Grove, K.L., Smith, M.S. (2013). Cocaine- and amphetamine-regulated transcript is a potent stimulator of GnRH and kisspeptin cells and may contribute to negative energy balance-induced reproductive inhibition in females. *Endocrinology* 154, 2821-2832.
 27. Roa, J., Herbison, A.E. (2012). Direct regulation of GnRH neuron excitability by arcuate nucleus POMC and NPY neuron neuropeptides in female mice. *Endocrinology* 153, 5587-5599.
 28. Fuxe, K., Andersson, K., Harfstrand, A., Agnati, L.F., Eneroth, P., Janson, A.M., Vale, W., Thorner, M., Goldstein, M. (1986). Medianosomes as integrative units in the external layer of the median eminence. Studies on grf/catecholamine and somatostatin/catecholamine interactions in the hypothalamus of the male rat. *Neurochemistry international* 9, 155-170.